

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication : **2 745 718**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

(21) N° d'enregistrement national : **96 02955**

(51) Int Cl⁶ : A 61 K 31/195, A 61 K 35/78

(12) **DEMANDE DE BREVET D'INVENTION**

A1

(22) Date de dépôt : 08.03.96.

(30) Priorité :

(71) Demandeur(s) : SOCIÉTÉ CIVILE DE GESTION
JOUVENET SOCIÉTÉ CIVILE — FR.

(72) Inventeur(s) : SAUVAIRE YVES et RIBES GERARD.

(43) Date de la mise à disposition du public de la
demande : 12.09.97 Bulletin 97/37.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule.*

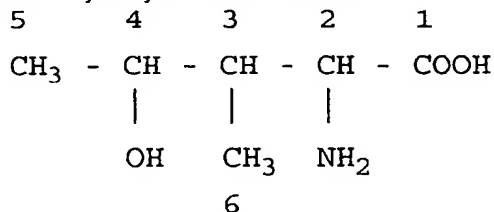
(60) Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire : CABINET HERRBURGER.

(54) COMPOSITION ANTIDIABÉTIQUE A BASE DE 4-HYDROXYISOLEUCINE.

(57) Composition antidiabétique apte à stimuler la sécré-
tion d'insuline et spécialement destinée au traitement du
diabète non insulino dépendant, caractérisée en ce qu'elle
renferme, en tant que substance active, l'isomère (2S, 3R,
4S) de la 4-hydroxyisoleucine de formule:



et/ou sa forme lactonique, et en ce qu'elle est pratique-
ment exempte de tout autre stéréoisomère de ce composé.

« Composition antidiabétique à base de 4-hydroxyisoleucine »

La présente invention se rapporte à une composition antidiabétique apte à stimuler la sécrétion d'insuline et spécialement destinée au traitement du diabète de type II ou diabète non insulino dépendant.

Il est connu que le diabète touche, aujourd'hui, plus de trente millions d'individus dans le monde, prenant la dimension d'un phénomène majeur sur le plan de la santé publique ; à titre d'exemple, on considère que, dans les pays européens, le diabète atteint entre 2 et 5 % de la population, et qu'en France, environ 3 à 4 % des habitants souffrent de diabète non insulino dépendant qui est de loin le plus fréquent et en particulier entre 5 et 10 % des sujets âgés de 60 à 70 ans souffrent de cette maladie.

De plus, et pour diverses raisons liées notamment à la richesse alimentaire, l'obésité, le tabagisme ou encore la diminution de l'activité physique, le nombre de diabétiques aurait doublé en France en une vingtaine d'années, essentiellement du fait d'une augmentation du diabète non insulino dépendant.

Cette affection est caractérisée par une altération de la sécrétion d'insuline associée ou non à une insulino résistance des tissus périphériques. L'altération du fonctionnement des cellules B pancréatiques qui synthétisent l'insuline, survient dès la phase initiale du diabète

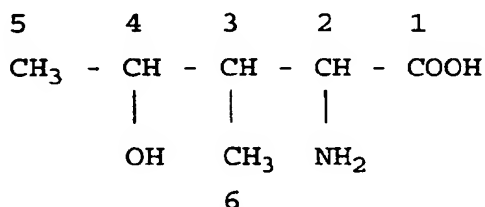
non insulino dépendant. Elle se traduit par une très nette diminution de la sécrétion d'insuline en réponse à une stimulation glucosée.

Pour traiter cette maladie, les spécialistes ont en conséquence été tout naturellement amenés à rechercher des produits susceptibles de stimuler la sécrétion d'insuline ; parmi ceux-ci, seuls les sulfamides (sulfonylurées) ont, dans un premier temps, révélé une efficacité.

Cependant, malgré leurs avantages, les sulfonylurées présentent un certain nombre d'inconvénients avant tout liés aux difficultés rencontrées pour déterminer la posologie adéquate ; il en résulte des risques de surdosage pouvant provoquer fréquemment des hypoglycémies, avec risque de coma hypoglycémique, notamment chez les personnes âgées.

Pour remédier à ces inconvénients, on a en conséquence cherché à proposer un médicament de nature à se substituer aux sulfonylurées pour stimuler la sécrétion d'insuline.

C'est ainsi que, conformément au document EP-0 587 476, on a pu mettre en lumière les propriétés anti-diabétiques de certains acides aminés mono ou polyhydroxylés parmi lesquels le plus actif s'est révélé être la 4-hydroxyisoleucine de formule :



et/ou sa forme lactonique.

Conformément à cette publication, on a en particulier proposé un procédé d'extraction de la 4-

hydroxyisoleucine à partir de graines d'une espèce particulière de trigonelles (Trigonella sp : le fenugrec Trigonella fœnum-graecum L) qui est une légumineuse facilement cultivable dans les régions méditerranéennes.

5 Ce procédé consiste à mettre en oeuvre les étapes suivantes :

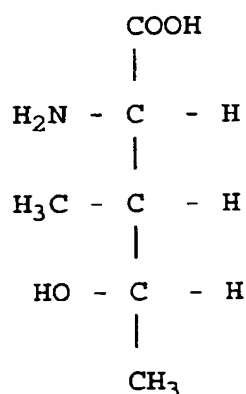
- on soumet des graines de fenugrec à un broyage et à une extraction préalable à l'hexane, à température ambiante de façon à obtenir un tourteau délipidé,
- 10 - on soumet ce tourteau à plusieurs extractions hydro-alcooliques successives avec de l'éthanol à 70 % à température ambiante,
- on concentre l'extrait obtenu sous pression réduite,
- on fait passer le concentrat sur une colonne contenant
15 une résine échangeuse de cations sous forme H^+ de façon à retenir la 4-hydroxyisoleucine recherchée sur cette colonne,
- on élue celle-ci en utilisant une solution d'ammoniaque N ou 2N,
- 20 - après concentration et reprise par de l'éthanol à 70 %, on soumet le mélange obtenu à une chromatographie d'adsorption sur gel de silice, et
- on élue celui-ci avec de l'éthanol à 70 % avant de le concentrer sous vide et de le purifier par cristallisa-
25 tion avec addition d'éther diéthylique de façon à obtenir une 4-hydroxyisoleucine titrant 99 % de pureté.

Pour permettre aux malades de pouvoir bénéficier des propriétés antidiabétiques toutes particulières de la 4-hydroxyisoleucine, il a été décidé de poursuivre les
30 recherches sur ce produit : en effet, la mise sur le marché d'un médicament nouveau exige une connaissance et une description précise du principe actif ; or, le squelette de la 4-hydroxyisoleucine renferme trois carbones asymétriques successifs et comporte, par suite, huit stéréo-isomères
35 pouvant être définis par les notations standardisées (2S,

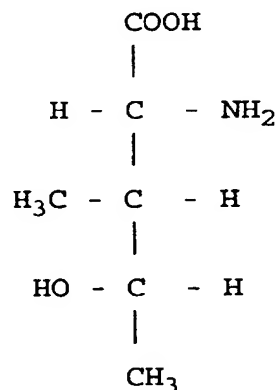
3R, 4S) ; (2S, 3R, 4R) ; (2R, 3S, 4R) ; (2R, 3S, 4S) ; (2S, 3S, 4S) ; (2S, 3S, 4R) ; (2R, 3R, 4R) ; (2R, 3R, 4S).

Compte tenu de cette situation, on a eu l'idée de rechercher, conformément à l'invention, au(x)quel(s) de ces isomères devaient être attribuées les caractéristiques antidiabétiques ou tout au moins l'essentiel de ces caractéristiques.

On a, à cet effet, tenu compte des travaux de Fowden et al. (Phytochemistry, 1973, vol.13, pp. 1707 à 1711) et d'Alcock et al (Phytochemistry, 1989, vol.28, pp. 1835-1841) conformément auxquels on a pu établir qu'à l'état naturel, le Fenugrec ne renferme que deux isomères de la 4-hydroxyisoleucine (diastéréoisomères sur le carbone 2) à savoir les isomères suivants :



Isomère (2S, 3R, 4S)

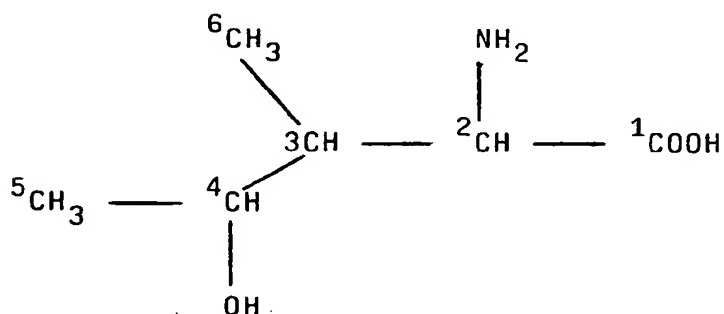


Isomère (2R, 3R, 4S)

Plus précisément, il a été prouvé que le Fenugrec renferme environ 97 % d'isomère (2S, 3R, 4S) qui doit donc être considéré comme l'isomère majeur et environ 3 % d'isomère (2R, 3R, 4S) qui doit être considéré comme l'isomère mineur.

Conformément à l'invention, on a constaté expérimentalement que lorsque l'on extrait des graines de Fenugrec par le procédé susmentionné, décrit dans le document

EP-A-0 587 476, à petite échelle, on obtient la 4-hydroxyisoleucine en conservant essentiellement les proportions susmentionnées d'isomère majeur et d'isomère mineur ; les caractéristiques physico-chimiques de l'isomère majeur ont été déterminées et correspondent à la structure (2S, 3R, 4S).



Cette configuration a pu être attribuée grâce aux mesures suivantes et par analogie avec les travaux antérieurs :

- Pouvoir rotatoire (Perkin-Elmer) $[\alpha]_D^{20}$: + 31.3 (c=1.2, H₂O).
- Spectrométrie infrarouge (Perkin-Elmer, FT-IR, Paragon 1000) dont les résonances sont les suivantes en cm⁻¹ : ν_{\max} 3500-2000, 1634, 1490, 1415, 1356, 1312, 1270, 1180, 1104, 1053, 1017, 962, 931, 899, 858, 817, 794.
- Spectrométrie de masse (JEOL, JMS-SX 102A) selon la technique « fast atom bombardement » en modes positif et négatif avec une matrice de glycérol-thioglycéril :
FAB+ : 148 (M+H)⁺100 ; FAB- : 146 (M-H)⁺100
- Spectrométrie RMN ¹H et ¹³C (Bruker AC 250 MHz) dont les déplacements chimiques sont les suivants (en ppm : δ)
¹H NMR δ : 1 (d, 3H, J=7, CH₃C-3) ; 1,29 (d, 3H, J=6,3, CH₃C-4) : 1,97 (qdd, 1H, J=7/4/8, CH-3) ; 3,88 ((qd, 1H, J)=8/6,3, CH-4) ; 3,94 (d, 1H, J=4, CH-2).

^{13}C NMR δ : 38,6(C₆), 47,2(C₅), 67,8(C₃), 83,5(C₂),
96,4(C₄), 200(C₁).

Les figures 1a à 1f ont permis d'établir les
5 caractéristiques physico-chimiques de l'isomère (2S, 3R,
4S) de la 4-hydroxyisoleucine.

Plus précisément, la figure 1a correspond à la
chromatographie HPLC tandis que les figures 1b à 1f repré-
sentent respectivement le spectre IR, le spectre de masse
10 « FAB » mode positif, le spectre de masse « FAB » mode né-
gatif, le spectre RMN¹H et le spectre RMN¹³C.

On s'est, en revanche, rendu compte que si l'on
 transpose le procédé susmentionné à une échelle supérieure
pour laquelle les différentes étapes exigent des temps plus
15 importants, on obtient un produit comportant environ 85 à
90 % d'isomère majeur et environ 10 à 15 % d'isomère mi-
neur.

Partant de ces constatations, on a cherché à
séparer les deux diastéréoisomères par chromatographie en
20 utilisant une colonne semi-préparative ultrabase C₁₈ qui
est caractérisée par une hydrophobicité élevée et un indice
de silanol résiduel très faible, donc une capacité de ré-
tention élevée ; il est connu que de telles colonnes sont
adaptées pour effectuer la séparation de composés présen-
25 tant des groupements fonctionnels très polaires, comme les
substances acides ou basiques.

On a ainsi purifié 2 grammes d'un mélange obte-
nu suite à la mise en oeuvre du procédé susmentionné dans
les conditions suivantes :

- Support : colonne semi-préparative ultrabase C₁₈,
5μM (10 mm x 15 cm)
- Détecteur : UV (190 à 220 nm) ou réfractomètre,
- Eluant : eau pure,
- 5 - Débit : 2 ml/min.

Il est à noter que l'utilisation d'eau pure comme solvant de dilution s'est avérée indispensable car l'alcool perturbe la séparation.

10 Une étude analytique préalable effectuée sur 10 μg de mélange a permis de vérifier que le temps de rétention était de 9,6 min. pour l'isomère mineur et de 10,2 min. pour l'isomère majeur et qu'il était donc ainsi possible de séparer les deux isomères présents.

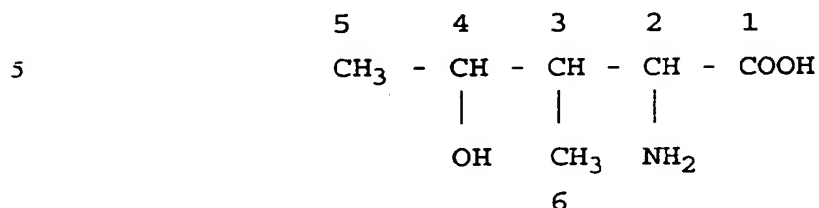
15 Cette possibilité a été confirmée par l'expérience et, la mise en oeuvre du procédé de séparation a effectivement permis d'obtenir, à partir des deux grammes initiaux, et après purification, d'une part, plus de 400 mg d'isomère mineur pratiquement pur et d'autre part, environ
20 1,5 g d'isomère majeur avec une pureté de 97 à 98 % identique au composé isolé à partir du document EP-A-0 587 476.

Conformément à l'invention, on a ensuite mis en oeuvre des tests pharmacologiques pour vérifier l'activité antidiabétique de chacun des isomères ainsi purifiés et on
25 a constaté que le plus puissant (eutomer) renfermant la majeure partie de l'activité antidiabétique est l'isomère majeur tandis que l'isomère mineur s'avère nettement moins puissant (distomer).

La présente invention a pour objet de tirer
30 profit de ces constatations expérimentales en proposant une composition antidiabétique nouvelle apte à stimuler la sécrétion d'insuline et spécialement destinée au traitement du diabète non insulino dépendant.

Conformément à l'invention, cette composition
35 antidiabétique est caractérisée en ce qu'elle renferme, en

tant que substance active, l'isomère (2S, 3R, 4S) de la 4-hydroxyisoleucine de formule :



10 et/ou sa forme lactonique, et en ce qu'elle est pratiquement exempte de tout autre stéréoisomère de ce composé.

Selon une caractéristique préférentielle de l'invention, cette substance active est d'origine végétale, et est notamment obtenue à partir de trigonelles
 15 (Trigonella sp.) et plus particulièrement extraite de graines de fenugrec (Trigonella fœnum-graecum L.).

L'activité antidiabétique toute particulière de l'isomère (2S, 3R, 4S) de la 4-hydroxyisoleucine sera mise en lumière grâce à l'exemple suivant, portant sur une investigation au niveau des îlots de Langerhans isolés de
 20 pancréas de rat.

Après digestion du pancréas par la collagénase, les îlots de Langerhans qui possèdent des cellules B sécrétant l'insuline ont été séparés des autres éléments du digestat, prélevés sous la loupe binoculaire, puis déposés
 25 dans des tubes d'incubation. Cette méthode, qui présente l'avantage de ne nécessiter qu'une faible quantité de substance, permet une étude directe des effets de la composition sur des cellules endocrines pancréatiques, en particulier des cellules B insulino sécrétrices, à l'exclusion
 30 de toute interférence avec les tissus exocrines et annexes.

Sur des îlots isolés de rats Wistar, incubés en présence de 8,3 mM de glucose (1,5 g/l) pendant une heure,
 35 on a recherché l'effet de 200 µM d'isomère majeur de la 4-

hydroxyisoleucine, d'une part, et de 500 μ M et 1 mM d'isomère mineur d'autre part, sur la sécrétion d'insuline. Les résultats obtenus sont reportés sur la figure 2, sur lequel les histogrammes représentent pour chaque dose d'isomère de 4-hydroxyisoleucine la sécrétion d'insuline mesurée sur 60 minutes. Les valeurs données correspondent à chaque fois à la moyenne de 16 à 20 déterminations.

Sur ce schéma, on peut noter que pour l'isomère majeur, un effet stimulant significatif sur la sécrétion apparaît pour une concentration de 200 μ M, alors que dans le cas de l'isomère mineur, cet effet n'est observé que pour une concentration de 1 mM.

Cette étude pharmacologique permet donc bien de mettre en lumière l'activité supérieure de l'isomère majeur.

Ces résultats ont été confirmés par des expériences réalisées sur le pancréas isolé et perfusé en présence de 8,3 mM de glucose.

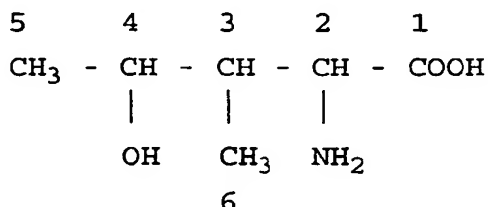
Conformément à ces expériences, dont les résultats sont reportés sur la figure 3, l'isomère majeur et l'isomère mineur de la 4-hydroxyisoleucine ont été introduits à une concentration de 200 μ M dans le milieu de perfusion pendant 10 minutes.

Les valeurs données correspondent à chaque fois à la moyenne de 4 à 6 expériences.

Ce schéma montre clairement que, dans le cas de l'isomère majeur, la stimulation est immédiate et biphasique et persiste pendant toute la durée de la perfusion alors qu'au contraire, aucun effet notable n'est observé dans le cas de l'isomère mineur.

R E V E N D I C A T I O N S

1°) Composition antidiabétique apte à stimuler la sécrétion d'insuline et spécialement destinée au traitement du diabète non insulino dépendant, caractérisée en ce qu'elle renferme, en tant que substance active, l'isomère (2S, 3R, 4S) de la 4-hydroxyisoleucine de formule :

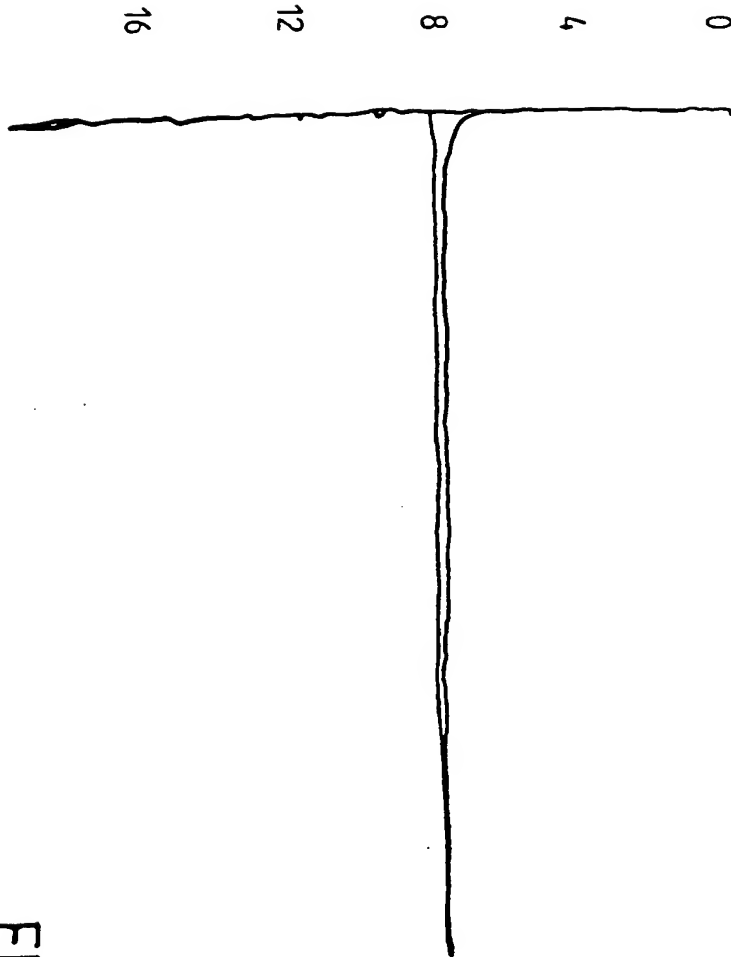


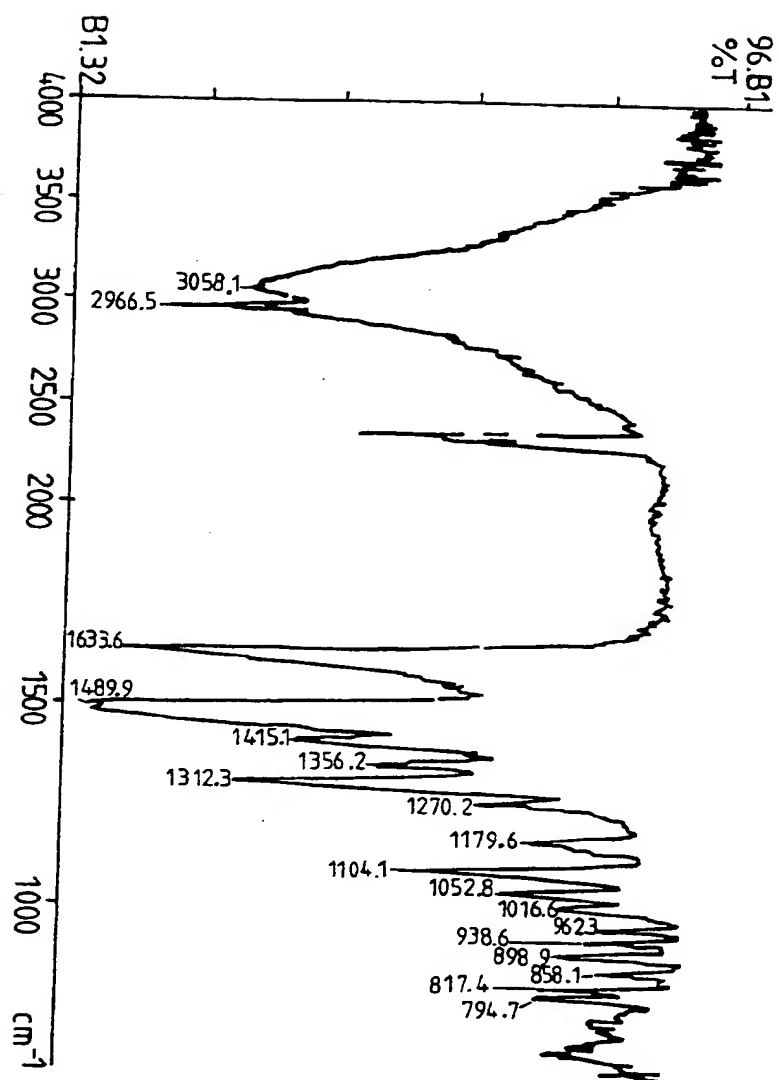
et/ou sa forme lactonique, et en ce qu'elle est pratiquement exempte de tout autre stéréoisomère de ce composé.

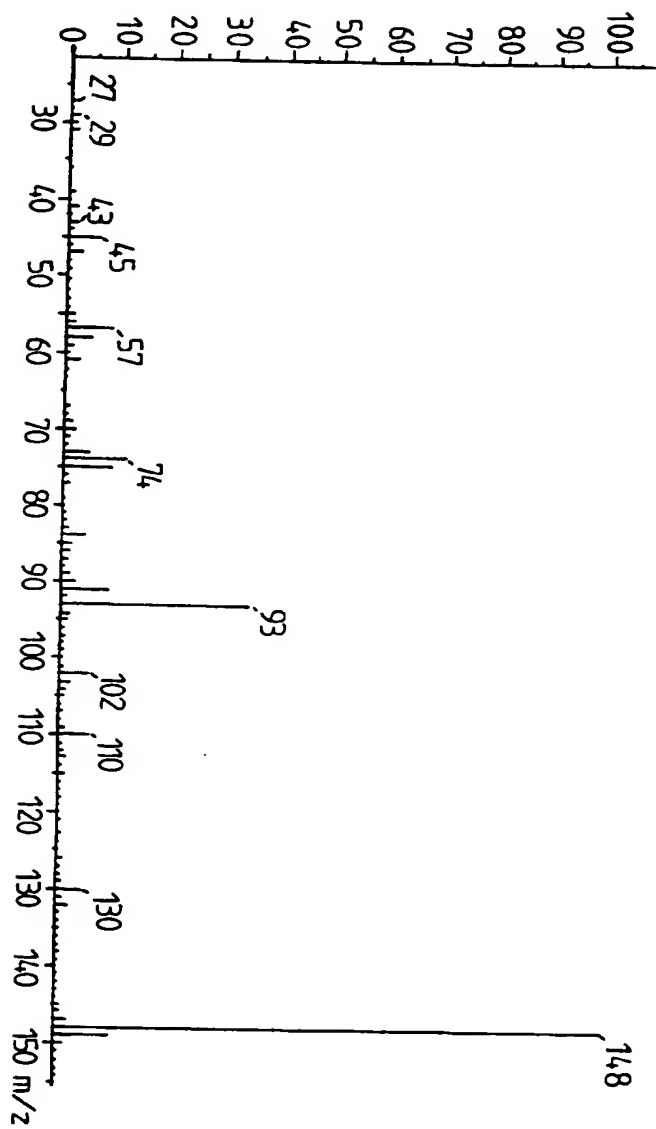
2°) Composition antidiabétique selon la revendication 1, caractérisée en ce que la substance active est d'origine végétale.

3°) Composition antidiabétique selon la revendication 2, caractérisée en ce que la substance active est obtenue à partir de trigonelles (Trigonella sp).

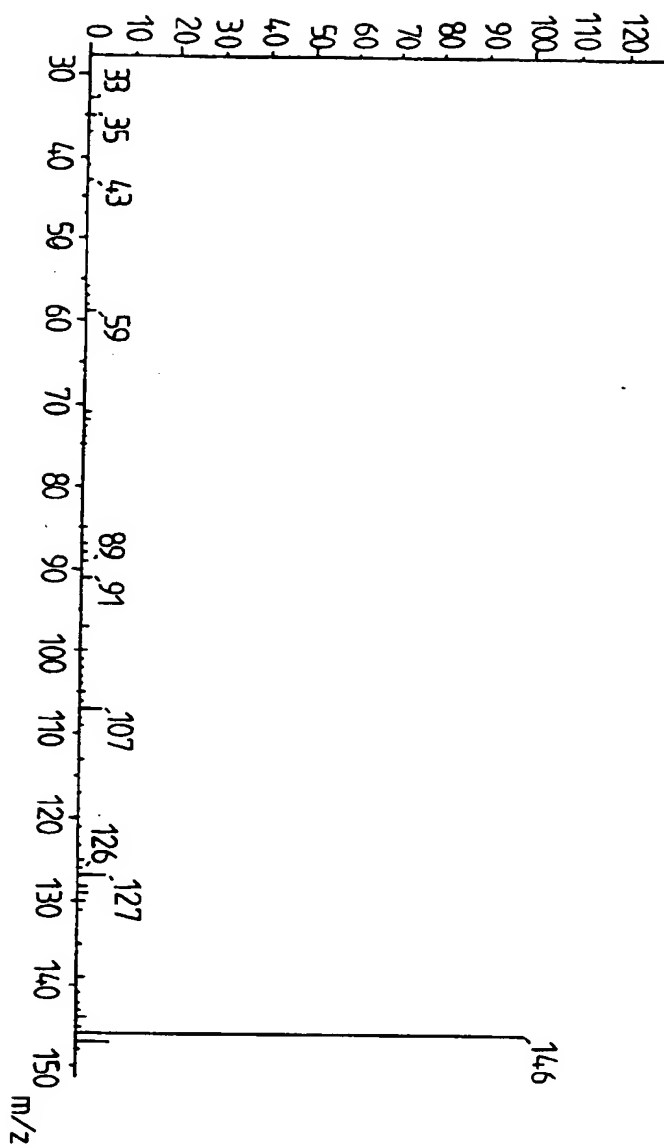
4°) Composition antidiabétique selon la revendication 3, caractérisée en ce que la substance active est extraite de graines de fenugrec (Trigonella fenum-graecum L).

FIG. 1a

FIG. 1b

FIG. 1c

418

FIG. 1d

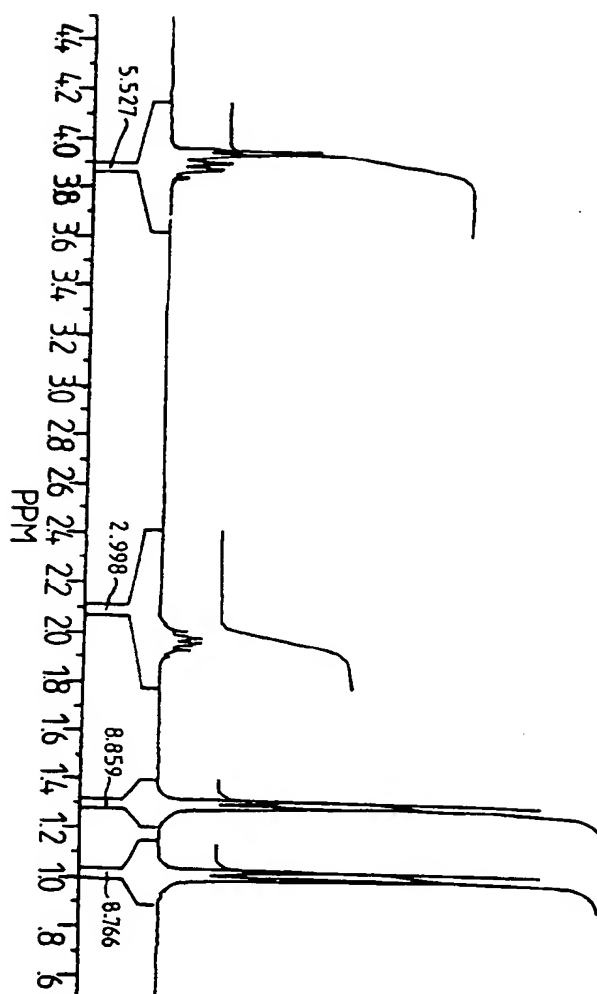
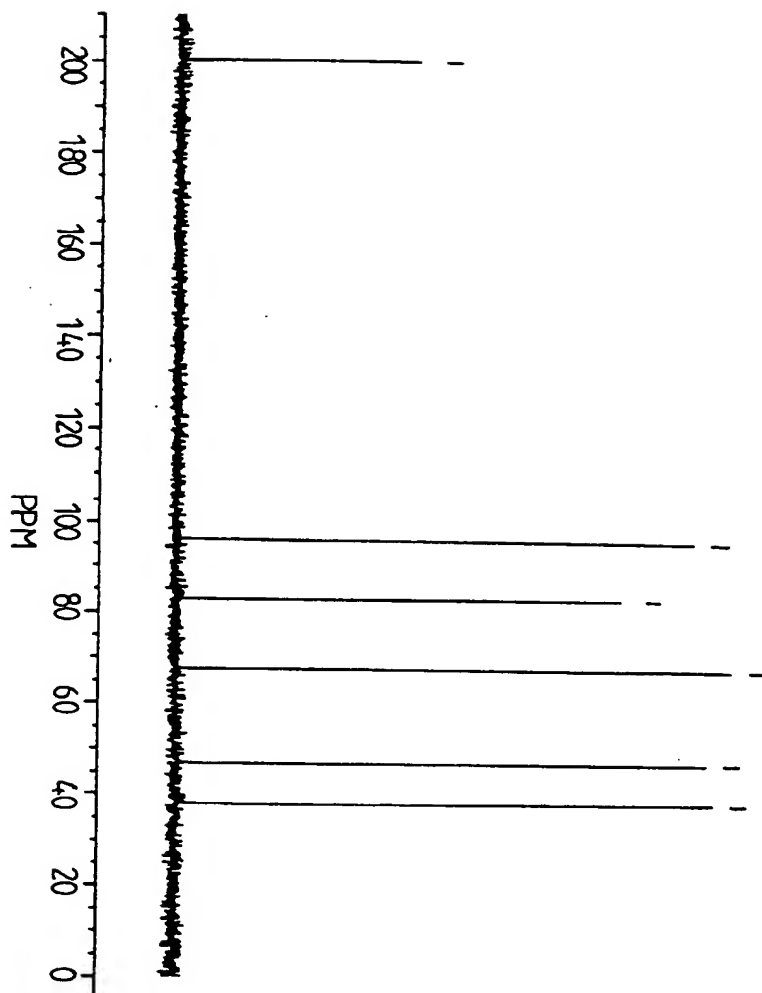
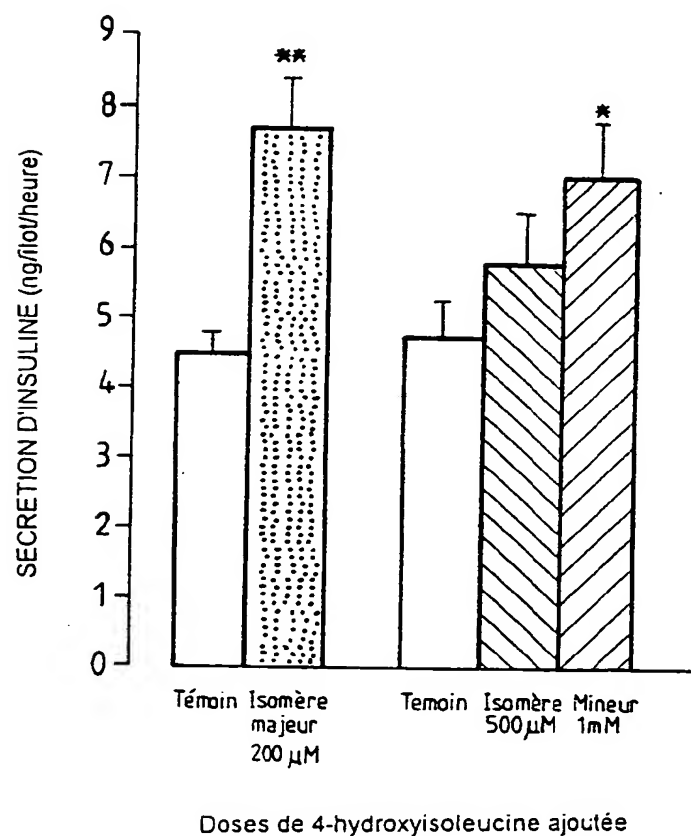


FIG. 1e

618

FIG. 1f

Evaluation des effets comparés de l'isomère majeur et de l'isomère mineur de la 4-hydroxyisoleucine sur la sécrétion d'insuline par les îlots de Langerhans isolés et incubés en présence de glucose 8,3 mM

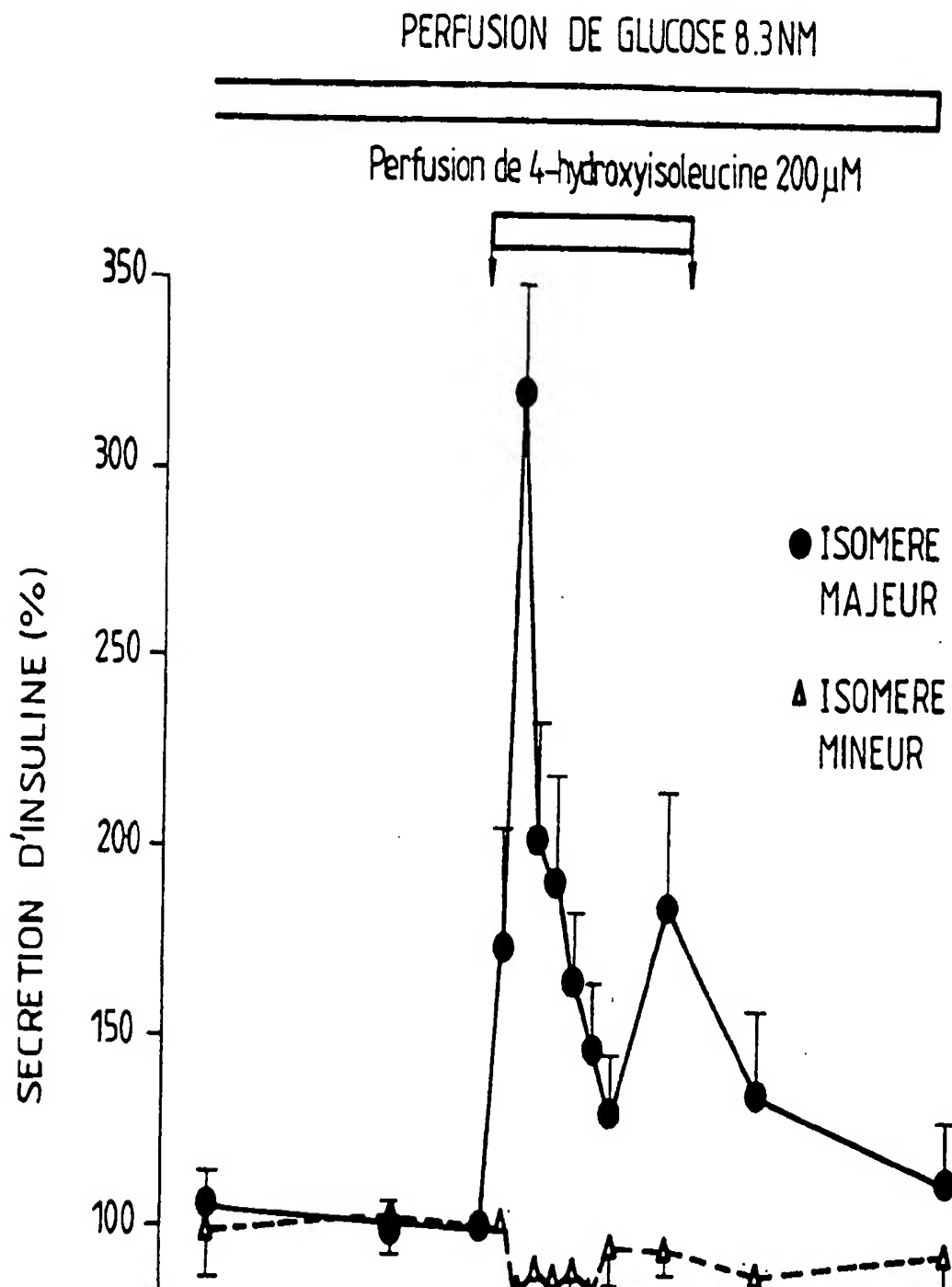


* $p < 0,05$

** $p < 0,001$

FIG. 2

Effet sur la sécrétion d'insuline d'un pancréas isolé de rat
d'une perfusion de 4-hydroxyisoleucine à la concentration de
 $200\mu\text{M}$ pendant 10 min.



RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIREétabli sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche2745718
N° d'enregistrement
nationalFA 527020
FR 9602955

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
T	DIABETOLOGIA, vol. 39, 1 Septembre 1996, page A234 XP000610228 * résumés no. 887 et 888 * ---	1-4
X	DIABETOLOGIA, vol. 38, 12 Septembre 1995, page A101 XP002020594 P.PETIT ET AL.: "INSULIN STIMULATING EFFECT OF AN ORIGINAL AMINO ACID, 4-HYDROXYISOLEUCINE, PURIFIED FROM FENUGREEK SEEDS" * résumé no.388 * ---	1-4
D,X	EP 0 587 476 A (LABORATOIRES MONAL) 16 Mars 1994 * le document en entier * ---	1-4
D,A	PHYTOCHEMISTRY, vol. 28, no. 7, 1989, pages 1835-1841, XP000610220 N.W. ALCOCK ET AL.: "STEREOCHEMISTRY OF THE 4-HYDROXYISOLEUCINE FROM TRIGONELLA FOENUM-GRÆCUM" * le document en entier * ---	1-4
A	TETRAHEDRON, vol. 47, no. 32, 1991, pages 6469-6482, XP000611434 T. INGHARDT ET AL.: * page 6470, alinéa 5 * * page 6480 * ---	1-4
-/--		
Date d'achèvement de la recherche		Examinateur
9 Décembre 1996		Hoff, P
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons - - - - - A : membre de la même famille, document correspondant</p>		

REPUBLIQUE FRANÇAIS

INSTITUT NATIONAL

de la

PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE

PRELIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

2745718

N° d'enregistrement
national

FA 527020

FR 9602955

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	NEW TRENDS IN NATURAL PRODUCTS CHEMISTRY, 1986, pages 123-141, XP002020595 M. HASAN: "THE DIASTEREOMERIC Y-HYDROXY-ISOLEUCINES" * abrégé * * page 124 * -----	1-4
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)

1

Date d'achèvement de la recherche

9 Décembre 1996

Examinateur

Hoff, P

CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES

X : particulièrement pertinent à lui seul
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un
autre document de la même catégorie
A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication
ou arrière-plan technologique général
O : divulgation non-écrite
P : document intercalaire

T : théorie ou principe à la base de l'invention
E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure
à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date
de dépôt ou qu'à une date postérieure.
D : cité dans la demande
L : cité pour d'autres raisons

& : membre de la même famille, document correspondant

